

VU Research Portal

Mixture toxicity of metals to *Folsomia candida* related to (bio)availability in soil

Bongers, M.C.G.

2007

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Bongers, M. C. G. (2007). *Mixture toxicity of metals to *Folsomia candida* related to (bio)availability in soil*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam]. Gildeprint Drukkerijen B.V.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Mengseltoxiciteit van metalen voor *Folsomia candida* in relatie tot de (biologische) beschikbaarheid in de bodem

De laatste eeuw was er een enorme toename in de productie en het gebruik van chemische stoffen, inclusief bestrijdingsmiddelen. Dit ging vergezeld van een afname in aantallen van vele diersoorten, zoals roofvogels, vissen en amfibieën. Bezorgdheid om de milieuvervuiling en het gebruik van bestrijdingsmiddelen leidde tot de ontwikkeling van ecotoxicologie als wetenschappelijke discipline, die bijdroeg aan beoordeling van milieurisico's van vervuilende stoffen. In het begin richtte de ecotoxicologie zich vooral op het vinden van kwantitatieve dosis-effect relaties. Voor dit doel werden gestandaardiseerde toxiciteitstoetsen ontwikkeld. De risicobeoordeling richt zich op één stof tegelijkertijd alhoewel algemeen erkend wordt dat stoffen in veel blootstellingssituaties als mengsels voorkomen. Risicobeoordeling van complexe mengsels is echter voorsnog niet ver genoeg ontwikkeld. Als gevolg hiervan is er een grote vraag naar kennis op het gebied van mengseltoxiciteit.

Voor het beoordelen van gegevens over mengseltoxiciteit wordt normaliter het model van concentratieadditie of dat van onafhankelijke werking (responsadditie) als referentiemodel gebruikt. De interpretatie van de gevonden interacties beperkt zich tot de algemene uitspraak dat de stoffen elkaars werking versterken (synergisme) of verzwakken (antagonisme). De interactie tussen de stoffen in een mengsel kan echter ook afhangen van de verhouding (ratio) van de concentraties waarin de componenten in het mengsel aanwezig zijn en van het effectniveau (kijk je naar 10% of naar 50% afname in groei). Dergelijke verschillen in mengselwerking zijn in verschillende onderzoeken in de literatuur beschreven. Ik heb in mijn experimenten de metalen in verschillende verhoudingen toegevoegd, en zowel lage als hoge concentraties getest. Zo zijn de omstandigheden optimaal om het optreden van dit soort ratio- of effectniveau-afhankelijk effecten op de mengselwerking te vinden, als ze er inderdaad zijn.

Milieukundige risicoanalyse van stoffen *in de bodem* wordt ook nog belemmerd door de complexiteit van de relatie tussen de stof, de bodem en het organisme. Stoffen kunnen bij verschillende processen met elkaar interacteren: bij de binding aan bestanddelen van de bodem, tijdens de opname in het organisme en op de toxische effecten. Hierdoor is het moeilijk om een direct verband te leggen tussen totale (toegevoegde) concentraties van de stoffen en de effecten op het organisme dat in de bodem leeft. Doordat we niet weten of en hoe stoffen op deze verschillende processen interacteren is het moeilijk om de bevindingen van een specifiek mengsel voor een specifiek organisme te vertalen naar verwachte effecten van een ander mengsel van stoffen of voor een ander soort organisme of voor een ander bodemtype. Willen we meer algemene uitspraken over mengselwerking van stoffen voor bodemorganismen kunnen doen, dan moeten we de interacties tijdens de verschillende processen te weten komen.

Tijdens mijn onderzoek heb ik mengseltoxiciteitstesten uitgevoerd in een natuurlijke, maar wel gestandaardiseerde, grond (LUFA 2.2). Als proefdier heb ik springstaarten van de soort *Folsomia candida* gebruikt. Deze soort wordt zo'n 3 mm lang en is wit (zie de foto's op de omslag). Springstaarten zijn zeer algemeen voorkomende bodemarthropoden, nauw verwant aan insecten, en ze spelen een belangrijke rol in de afbraak van dood organisch materiaal. Springstaarten hebben hun naam te danken aan de zogenaamde springvork die ze onder hun achterlijf meedragen. Door de springvork uit te klappen kan het dier wegspringen om zo aan vijanden te ontkomen. Als teststoffen heb ik de metalen cadmium, koper, lood en

zink gebruikt. Metalen hebben al een lange geschiedenis waar het milieuvervuiling betreft. Daarom is er veel informatie over de giftigheid van metalen beschikbaar als uitgangsmateriaal. Ik heb de metalen in de vorm van metaalzouten aan de grond toegevoegd. Aangezien een metaalzout is samengesteld uit het metaal (als kation) en een anion, bijvoorbeeld chloride of nitraat, werd tegelijk met de metalen een vergelijkbare hoeveelheid anionen aan de grond toegevoegd. Uit eerder onderzoek is bekend dat deze anionen zelf ook giftig kunnen zijn, en dus ook meespelen in de waargenomen (metaal)toxiciteit in mijn testen. Door de grond na toevoeging van de metaalzouten door te spoelen met water kan de overmaat aan anionen worden verwijderd.

Mijn onderzoek was er op gericht de metaalinteractie voor de verschillende processen te specificeren en een relatie tussen de processen te leggen. Verder heb ik de rol van het anion in de metaaltoxiciteit bepaald. Chemische en fysisch-chemische interacties in de bodem bepalen welk deel van het toegevoegd metaal gebonden wordt en welk deel er vrij beschikbaar is voor een organisme. Er zijn verschillende extractiemethoden in gebruik als maat voor de beschikbaarheid van metalen. Hierbij is de extractie met sterke zuren (destructie) een maat voor de totale hoeveelheid metaal in de grond. Een extractie met water is een maat voor beschikbare metaal concentraties zoals die in het poriewater gevonden kunnen worden. Een extractie met een 0.01 M CaCl_2 -oplossing zit daartussenin; behalve vrij in de bodemoplossing aanwezige metalen worden hierbij ook de niet al te stevig gebonden metalen meebepaald (ook wel aangeduid als uitwisselbare fractie). Ook tijdens de opname van metalen door de springstaart kunnen interacties tussen de metalen voorkomen. Omdat onduidelijk is welk deel van het metaal in de bodem beschikbaar is voor springstaarten, heb ik de metaalgehalten in de dieren gerelateerd aan elk van de drie metaalfracties van de bodem. Zo kon ik bepalen of er sprake was van interactie tijdens de opname en tevens aangeven welke metaalfractie in de grond een goede maat is voor de biologische beschikbaarheid voor de springstaart.

Algemeen wordt aangenomen dat gehalten van stoffen *in* het dier bepalend zijn voor hun giftige werking. Wanneer tijdens de modelanalyses de toxische effecten gerelateerd worden aan interne metaalconcentraties in de springstaarten zouden de gevonden interacties de beste maat moeten zijn voor wat er tijdens de toxiciteitsprocessen in het dier plaats vindt. Door de gevonden effecten op de springstaarten te relateren aan elk van de verschillende metaalfracties in de grond en de interne concentraties in de springstaarten kan ik uiteindelijk aangeven wat elk proces bijdraagt aan de uiteindelijke interacties op het niveau van toxische effecten.

De volgende experimenten zijn uitgevoerd:

- Toxiciteitstesten met loodchloride en loodnitraat, met en zonder doorspoelbehandeling van de grond (hoofdstuk 2);
- Toxiciteitstesten met mengels van twee metalen: cadmium/lood, cadmium/koper en cadmium/zink (hoofdstuk 3);
- Toxiciteitstesten met mengsels van vier metalen (cadmium, lood, koper en zink), met en zonder doorspoelbehandeling van de grond (hoofdstuk 4 en 5).

De resultaten van deze testen werden geanalyseerd op mengselinteracties op elk van de verschillende niveaus.

In elk experiment nam de beschikbaarheid van de metalen in de mengsels toe (hoofdstuk 3-5). De metaalconcentraties in de grondextracten waren hoger in de mengsels in vergelijking met metalen apart. Het metaal dat het sterkst aan grond gebonden werd (lood) werd het minst beïnvloed door de aanwezigheid van andere metalen in een mengsel. Cadmium daarentegen bond het zwakst en werd in een gecombineerde blootstelling het gemakkelijkste door de andere metalen van bindingsplaatsen aan de bodem verdreven, wat tot hogere concentraties in extracten leidde. Cadmium was ook het meest giftig van de geteste metalen. Een afname van

de reproductie met 50% werd al bij een factor 10 lagere concentratie bereikt dan voor de andere metalen. Dat betekende automatisch dat de toegevoegde concentraties aan koper, lood en zink ook 10 keer zo hoog waren als die voor cadmium, wat tot gevolg had dat cadmium nog meer competitie ondervond om bindingsplaatsen aan de grond. Omdat de meeste bodemdieren via de bodemoplossing worden blootgesteld, is het dus aannemelijk dat de springstaarten in de mengsels aan hogere metaalconcentraties werden blootgesteld. Als de metalen in de mengsels elkaars beschikbaarheid in de grond vergroten, dan is de verwachting dat ze ook een groter effect op *F. candida* zullen hebben dan verwacht (synergisme).

De metaalgehalten in de springstaarten werden gerelateerd aan de totale, CaCl_2 -uitwisselbare en water-extraheerbare metaalfracties. Om interacties tijdens de opname van de metalen in de springstaarten aan te tonen, werden interne gehalten in springstaarten die waren blootgesteld aan een enkel metaal vergeleken met die blootgesteld aan mengsels. De opname van de metalen verschilde niet tussen metalen apart en in mengsels (hoofdstuk 3-5). In het mengsel van vier metalen was er weliswaar een kleine verhoging van de interne metaalgehalten te zien, maar dat stond niet in verhouding tot de toename in beschikbaarheid in de bodem zoals gemeten in de waterextracten. Het lijkt erop dat het totale metaalgehalte een betere maat is voor de beschikbaarheid van metalen voor *F. candida* dan de water-extraheerbare fractie. Behalve dat verhoogde beschikbaarheid van metalen in de bodem niet leidde tot verhoogde opname is het ook duidelijk dat het ene metaal de opname van het andere ook niet beïnvloedde. Het enige effect op metaalopname werd waargenomen voor de hoogste concentraties van het vier-metalen mengsel. Daar werd de metaalopname lager, maar dit kon worden teruggevoerd op zichtbare gedragsverandering van de springstaarten: ze meden het contact met de grond wat ertoe leidde dat ze ook minder blootgesteld werden. Omdat we geen gegevens hebben over de kinetiek van opname en eliminatie van de metalen in springstaarten, kan het zijn dat tegengestelde interacties wel aanwezig waren maar niet zijn opgemerkt. Op basis van mijn gegevens concludeer ik dat de metalen niet interacteren tijdens de opname door *F. candida*.

De metalen werkten antagonistisch op het niveau van toxische effecten (hoofdstuk 3-5). Dit werd in alle gevallen gevonden, ongeacht de samenstelling van het mengsel of de metaalfractie gebruikt in de analyses. Het relatieve aandeel cadmium in het mengsel bleek een belangrijke factor bij de verklaring van ratio-afhankelijke interacties. In de meeste gevallen nam de toxiciteit van het mengsel af als het aandeel cadmium in het mengsel toenam. Cadmium kwam in elk mengsel voor en het is zeer waarschijnlijk dat de complexering met chloride en mogelijk ook de inductie van het metaalbindende eiwit metallothioneïne de oorzaak is van deze antagonistische effecten. Verschil in de vorm van de interactie (synergisme of antagonisme) afhankelijk van het effect niveau (b.v. 10% versus 50% effect) werd minder vaak gevonden. Als er een dergelijke afhankelijkheid gevonden werd, veranderde de interactie steeds pas bij hoge concentraties: hoger dan 1,7 Toxische Eenheden (TE), waarbij 1 TE de metaal concentratie is die 50% effect geeft. Alleen de mengsels met een equitoxische ratio werden bij concentraties hoger dan 2 TE getest; de andere ratios bleven daaronder. Bij de mengsels met hoge concentraties metalen speelt osmotische stress door de hoge zoutgehalten een grotere rol dan bij lagere concentraties. Aldus zou een effectniveau-afhankelijke interactie een weerspiegeling kunnen zijn van een overgang van voornamelijk metaaltoxiciteit bij lage concentraties naar voornamelijk zoutstress of toxiciteit van het anion chloride bij hoge concentraties.

Het opsplitsen van het toxische proces in drie niveaus heeft inzicht verschaft in de interacties op verschillende onderliggende processen. Op het niveau van bodemchemische processen vond ik synergisme, in de metaalopname door *F. candida* vond ik geen interactie en op het toxische effect op groei, reproductie en overleving van *F. candida* vond ik

antagonistische werking van de metalen. Er kon geen verband worden gelegd tussen de gevonden interactie op het niveau van toxische effecten en de interacties die optraden in de bodemchemische processen en tijdens de opname van de metalen door de springstaarten.

De bijdrage van het anion aan de toxiciteit van de metaalzouten was significant. In de experimenten met loodzouten bleek chloride minder giftig te zijn dan nitraat (hoofdstuk 2) en daarom werd in de rest van de experimenten met chloridezouten gewerkt. Maar chloride had toch effect op de (mengsel)toxiciteit in alle experimenten, hetzij indirect door veranderingen in metaalbeschikbaarheid, hetzij direct door osmotische stress. Vergelijking van het vier metaalmengsel met en zonder doorspoelbehandeling liet zien dat in de standaard test chloride zorgde voor gedragsveranderingen, verminderde reproductie (door uitdrogen van de eieren) en in mindere mate geremde groei van de springstaarten. En, van tegenovergesteld effect: verminderde toxiciteit van cadmium door de vorming van niet-beschikbare cadmium-chloridecomplexen. Gezien alle negatieve effecten van chloride is het opvallend dat de interactie tussen de metalen in de mengselexperimenten met en zonder doorspoelbehandeling zulke vergelijkbare resultaten opleverde. Het verwijderen van het chloride leidde niet tot veranderingen in het interactiepatroon van de metalen in de grond, tijdens opname en op de toxische processen van het mengsel van vier metalen. Waarschijnlijk waren er wel veranderingen, maar heffen ze elkaar op. Het is zeer aannemelijk dat de overeenkomst in de interacties in aanwezigheid en afwezigheid van chloride zoals hier werd gevonden een speciaal geval is en dat de patronen waarschijnlijk wel zullen veranderen voor bijvoorbeeld andere metaalcombinaties, typen grond of organismen.

Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven, maakte gebruik van beschrijvende modellen om interactiepatronen te ontdekken voor de verschillende niveaus en heeft duidelijk gemaakt hoe complex interacties in mengseltoxiciteit voor bodemdieren zijn. Ondanks dat het grond-dier systeem nu in meerdere niveaus opgesplitst is, blijft elk niveau een zwarte doos. De algemene interactiepatronen kunnen nog steeds niet geïnterpreteerd worden in mechanistische termen en de vertaalslag naar ander mengsels en diersoorten kan daardoor niet worden gemaakt. Om de risico-analyse voor mengsels van stoffen mogelijk te maken, zou het het efficiëntst zijn om algemeen geldende gegevens te verkrijgen in plaats van soorten-, stof-, testsysteem- en tijdstipspecifieke gegevens. Het gebruik van toxiciteitsmodellen die gebaseerd zijn op algemene biologische processen is voor dit doel veelbelovend.